

- RAPPORT ANNUEL 1967 -

M. MEIFFREN

Au cours de l'année des progrès sensibles ont été réalisés dans les recherches sur la pourriture brune des cabosses du cacaoyer et la mise au point de l'antibiotique isolé des feuilles de Prunus Lusitanica.

L'étude des antifongiques présents dans les feuilles des végétaux supérieurs permet d'ores et déjà de les répartir en quelques groupes d'après la position systématique de la plante source.

Le stage effectué au Laboratoire par deux chercheurs vénézuéliens nous a donné l'occasion d'échanges de vue intéressants sur des problèmes phytopathologiques concernant le cacaoyer.

I - LA POURRITURE BRUNE DU CACAOYER

Rappelons que ces travaux ont pour but de rassembler des données susceptibles de permettre l'obtention de matériel résistant et qu'une collaboration étroite s'est établie entre l'Institut Français du Café et du Cacaoyer et le Laboratoire.

Comme l'année précédente une séance de travail a réuni les chercheurs de ces deux organismes en présence de Monsieur le Président du Comité Technique de Phytopathologie et de Zoologie Appliquée et de Monsieur le Directeur Général de l'I.F.C.C.

Monsieur TARJOT a fait le point des recherches qu'il conduit en Côte d'Ivoire. Il inocule désormais concurremment les cabosses détachées et en place. Cette technique doit lui permettre de détecter plus sûrement des caractères de résistance ou de tolérance. Il s'agit là en effet d'un problème majeur : dès que nous disposerons d'un indice de résistance les recherches devraient progresser rapidement.

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire  
N° : 22775  
Cote : B

Nous avons, Mademoiselle TANGUY et moi-même, exposé les résultats de nos travaux qui ont fait l'objet d'une note à l'Académie des Sciences, d'un article dans la revue "Café, Cacao, Thé" qui sont présentés en annexe et dont nous donnons ici un résumé.

Un certain nombre de substances phénoliques de l'épicarpe de cabosses trinitario et amelonado ont été caractérisées et purifiées. L'action de ces substances sur Phytophthora palmivora a été étudiée. La plupart présentent un pouvoir fongistatique. Nous donnons pour les plus intéressantes d'entre elles la concentration minimale inhibitrice de la croissance de ce champignon et de Pestalozzia coffeicola utilisé dans les essais de routine pour la recherche de substances antifongiques. Il est ainsi possible d'en évaluer l'intérêt. Les esters des acides férulique et coumarique présentent une C.M.I. remarquable.

On peut concevoir que ces composés qui s'accumulent dans les tissus en réaction à l'invasion du parasite jouent un rôle dans les mécanismes de défense de la plante hôte. Il reste à démontrer qu'ils atteignent les concentrations supérieures ou égales au seuil d'inhibition de la croissance du champignon. Ceci est possible si on admet avec TOMIYAMA et ses collaborateurs (1) qu'ils migrent de la cellule saine vers la cellule infectée. Ces auteurs estiment en effet que si la migration se fait d'une couche de cellules voisines la concentration augmente cinq fois et vingt fois si deux couches de cellules sont impliquées. Nous avons noté qu'une accumulation se produisait globalement dans la zone marginale. Ce processus a dont lieu et notre hypothèse paraît acceptable.

Monsieur et Madame REYES, chercheurs vénézuéliens, ont effectué un stage au Laboratoire en septembre et octobre. Ils étudient une grave maladie du cacoyer dite "de la machette" provoquée par Ceratocystis fimbriata. En collaboration avec Mademoiselle TANGUY ils ont caractérisé et purifié des substances phénoliques des feuilles et tiges de cacoyers résistants et sensibles, sains et inoculés.

Une substance qui s'accumule en réaction à l'infection, dans le cas du matériel résistant, l'ester acide gentisique-glucose s'est révélée fongistatique.

---

(1) TOMIYAMA K., SAKAI R., SAKUMA T., ISHIZAKA N. - The role of polyphenols in the defense reaction in plants induced by infection, in Proceedings of a conference held at GAMAGORI, Japan, 15-21 mai 1966.

Cette convergence de résultats obtenus pour une même plante hôte avec des parasites ayant une position systématique éloignée, agissant sur des organes différents, constitue une indication encourageante.

Par ailleurs nous avons étudié avec ces chercheurs les activités pectinolytiques et cellulolytiques de deux souches de Ceratocystis fimbriata, l'une isolée de criollo, l'autre de trinitario. Les deux souches possèdent une polygalacturonase très active et une cellulase peu active. La première présente en outre une activité de pectinéméthylestérase intéressante.

## II - RECHERCHE DE SUBSTANCES ANTIFONGIQUES DANS LES TISSUS DE VEGETAUX SUPERIEURS

Famille des liliacées. - De nombreux représentants de cette famille retiennent l'attention. On trouve en effet dans différents organes des substances ayant un pouvoir antifongique élevé. Il s'agit essentiellement de saponines et de composés phénoliques. Chez une même espèce les deux types de substances coexistent parfois et, dans un cas, un phénomène de synergie a pu être noté.

L'étude des composés phénoliques de ce groupe est en cours. Pour une espèce Polygonatum multiflorum, le sceau de Salomon, une saponine a été extraite. Ce travail a fait l'objet d'une note qui est donnée en annexe. Des saponines antifongiques ont pu être isolées d'autres espèces. Ainsi à partir de l'extrait méthanolique de feuilles de fragon, Ruscus aculeatus, de muguet, Convallaria mialis et de Yuque à feuilles d'aloès, Yucca aloifolia, des saponines voisines de celle du sceau de Salomon ont été purifiées par chromatographie sur papier.

## III - NOUVELLES RECHERCHES SUR LA SUBSTANCE ANTIFONGIQUE EXTRAITE DES FEUILLES DE PRUNUS LUSITANICA

Peu de temps après la rédaction du précédent rapport la substance active a été obtenue par distillation. Un distillat très concentré a été remis à Monsieur le Docteur DROUHET de l'Institut Pasteur. Celui-ci a procédé à des essais in vitro

qui ont donné les résultats attendus. Par contre les essais de traitement de la teigne du cobaye n'ont pas reproduit les guérisons obtenues précédemment avec une préparation de "corps jaune" dissous dans l'huile minérale. On sait que le "corps jaune" contient outre la substance phénolique un caroténoïde (cf rapport 1966).

Il a pu être démontré que le caroténoïde ne joue aucun rôle in vitro. Des essais qui porteront sur son action éventuelle in vivo et sur la nature de l'excipient vont être entrepris à l'Institut Pasteur.

Sur ce sujet, une note en collaboration avec le Docteur DROUHET est en préparation.

Nous traiterons successivement les points suivants :

- 1°) Distillation-Influence de l'hydrolyse préalable
- 2°) Caractérisation de la substance active
- 3°) Mise au point d'une méthode de "dosage"
- 4°) Recherches sur la nature de l'excipient.

#### 1°) Distillation

La concentration sous vide des extraits aqueux s'accompagnait d'une baisse relative des seuils d'activité. De plus l'odeur caractéristique de la substance se retrouvait dans le ballon récepteur. Ceci nous a conduit à essayer l'entraînement à la vapeur.

Un dispositif classique a été utilisé : un générateur de vapeur est relié au récipient contenant l'extrait aqueux. Les vapeurs sont entraînées, condensées sur les parois d'un réfrigérant et recueillies. La liqueur obtenue est active à des concentrations sensiblement égales à celles de l'extrait aqueux.

Dans une seconde série d'essais on a procédé par distillation fractionnée. Les distillats se sont révélés plus actifs que l'extrait aqueux et en définitive, la méthode suivante a été retenue.

Le matériel sec réduit en poudre est mélangé énergiquement avec de l'eau dans la proportion de 20 % de poids frais, soit 8 % de poids sec. Après 48 heures de macération on distille sans filtrer. Le dispositif suivant est utilisé : un ballon surmonté d'un tube à pointes de VIGREUX est relié par un coude à un réfrigérant droit. Les vapeurs sont recueillies dans un récipient plongé dans un bac d'eau glacée afin d'éviter les pertes au maximum.

Par des distillations successives et en recueillant la moitié du volume initial on augmente la teneur en substance active.

Hydrolyse préalable. - En procédant à une hydrolyse acide avant distillation la teneur en substance active est doublée s'il s'agit de matériel frais. Dans le cas du matériel sec le gain est beaucoup moins marqué.

La technique de HERISSEY et LAFOREST (1) est utilisée : après macération le mélange est maintenu 3h30 au bain-marie bouillant sous réfrigérant après addition d'acide sulfurique à raison de 1,5 %.

Comparaison de la substance active obtenue par distillation à celle qui est séparée du "corps jaune".

A partir du corps jaune deux taches avaient été mises en évidence par chromatographie en couches minces en utilisant comme solvant le mélange éther sulfurique-trichloréthylène 1/2 (V/V). Elles avaient pour Rf respectivement 0,56 et 0,92. Après élution et contrôle biologique il apparaissait que la substance active se trouvait dans la bande ayant pour Rf 0,56.

En utilisant la même technique avec le distillat on obtient une tache de même Rf et de même couleur. On constate qu'il y a superposition complète en plaçant comme "spot" de départ le mélange distillat "corps jaune".

---

(1) HERISSEY H. & LAFOREST J. - C.R. Ac.Sc., 1932, 194, 1095-1097.

## 2°) Caractérisation de la substance active

En préparant des chromatoplaques avec la substance active obtenue suivant l'une ou l'autre méthode et en utilisant comme révélateur le réactif de FOLIN-CIOCALTEU deux taches gris-bleu sont mises en évidence. L'une d'elle-nous l'avons dit- correspond à la substance antifongique dont la nature phénolique était ainsi indiquée.

Au cours du stage qu'elle a effectué à l'Université de Liverpool sous la direction de Monsieur le Professeur HARBORNE, Mademoiselle TANGUY a établi le spectre de la substance active dans différents solvants. En le comparant à ceux de phénols simples: eugénol, gaiacol, méta et para-crésol elle a constaté que la courbe de la substance active et celle du p-crésol présentaient deux pics pour les mêmes longueurs d'onde.

D'autre part HERISSEY et LAFOREST (1) ont extrait en 1932 des feuilles de Prunus lusitânica un glucoside dont le sucre est le rutinose et l'aglycone un dérivé benzylé qu'ils ont identifié en 1934 au chavicol.

Il serait intéressant de vérifier par spectrographie de masse si la substance que nous avons isolée est identique à celle qui a été caractérisée par ces auteurs à cette époque.

## 3°) Mise au point d'une méthode de "dosage".

Des mesures spectrales ont été effectuées sur la substance purifiée et sur des distillats avec et sans hydrolyse préalable d'une part, sur le p-crésol d'autre part, avec un spectrophotomètre UNICAM SP 500.

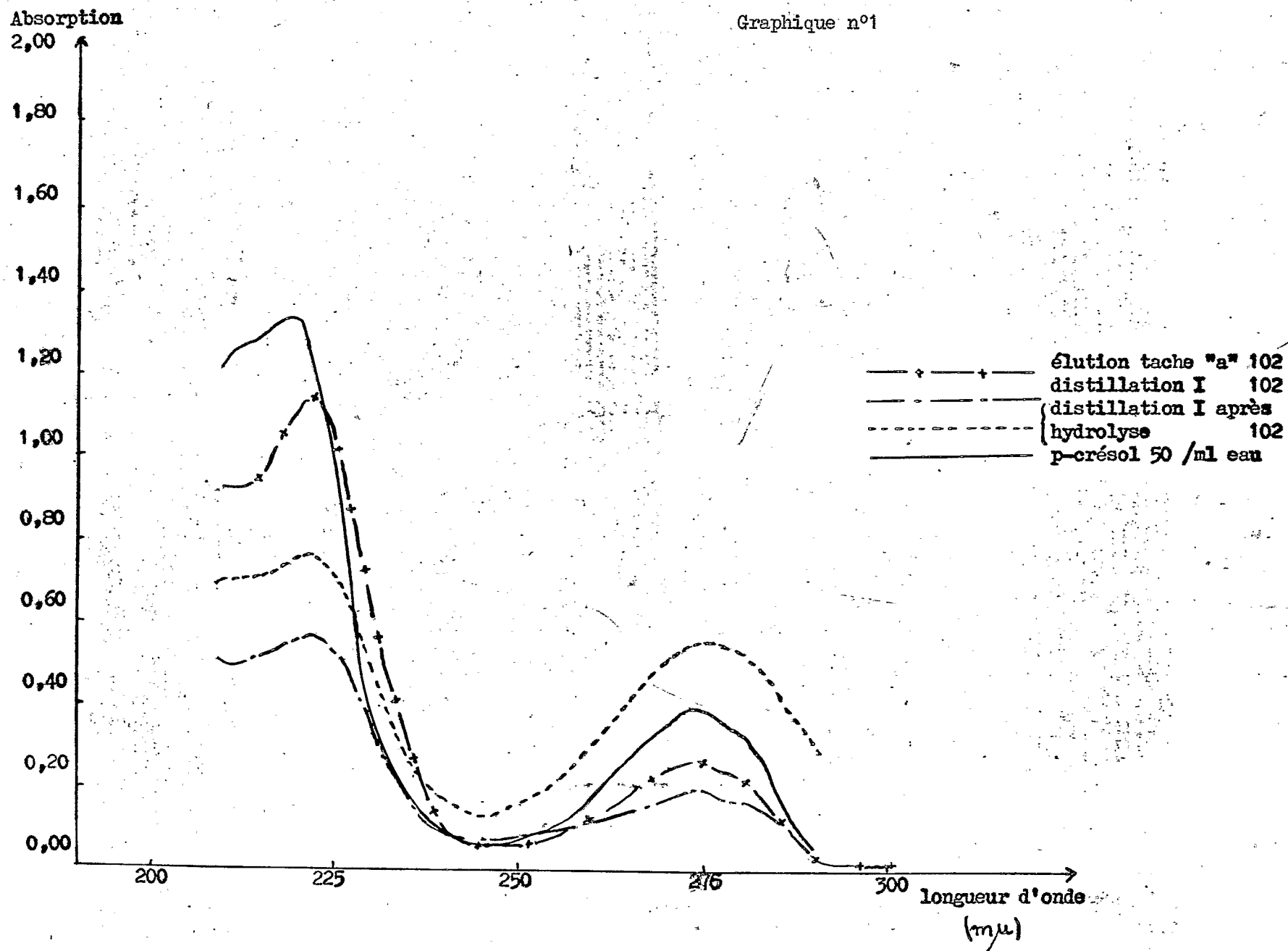
La purification de la substance a été réalisée à partir de distillat ou d'extrait éther de pétrole et l'élution faite avec du chloroforme. Après concentration du solvant le résidu est repris par l'eau. C'est à partir de cette solution que le spectre a été établie

Dans tous les cas les pics se situent effectivement dans les mêmes zones que ceux du p-crésol (cf graphique n° 1).

---

(1) HERISSEY H.- C.R. Ac. Sc., 1934, 198, 265-266.

Graphique n°1



	Longueur d'onde maximale	
	m $\mu$	
	dans l'eau	
p-crésol.....	219	et 274
Distillat 1.....	221	275
Distillat 1 après hydrolyse...	221	275
Eluat substance active (a)....	222	274

Les "dosages" des distillats qui sont effectués couramment correspondent bien avec les concentrations minimales inhibitrices exprimées en milligrammes de poids frais de matériel de départ par millilitre de milieu. Il est désormais aisé de fixer des doses utiles pour les essais biologiques.

#### Concentration des distillats.

Nous avons indiqué que par des distillations successives (D1, D2, D3, D4) et en ne recueillant que la moitié du volume initial il était possible d'augmenter la teneur en substance active (cf graphique n° 2). La densité optique du pic principal augmente avec la concentration et par là même avec l'activité biologique. Toutefois à partir de la quatrième distillation il y a saturation de la solution.

L'estimation comparative avec le p-crésol comme témoin donne les teneurs suivantes :

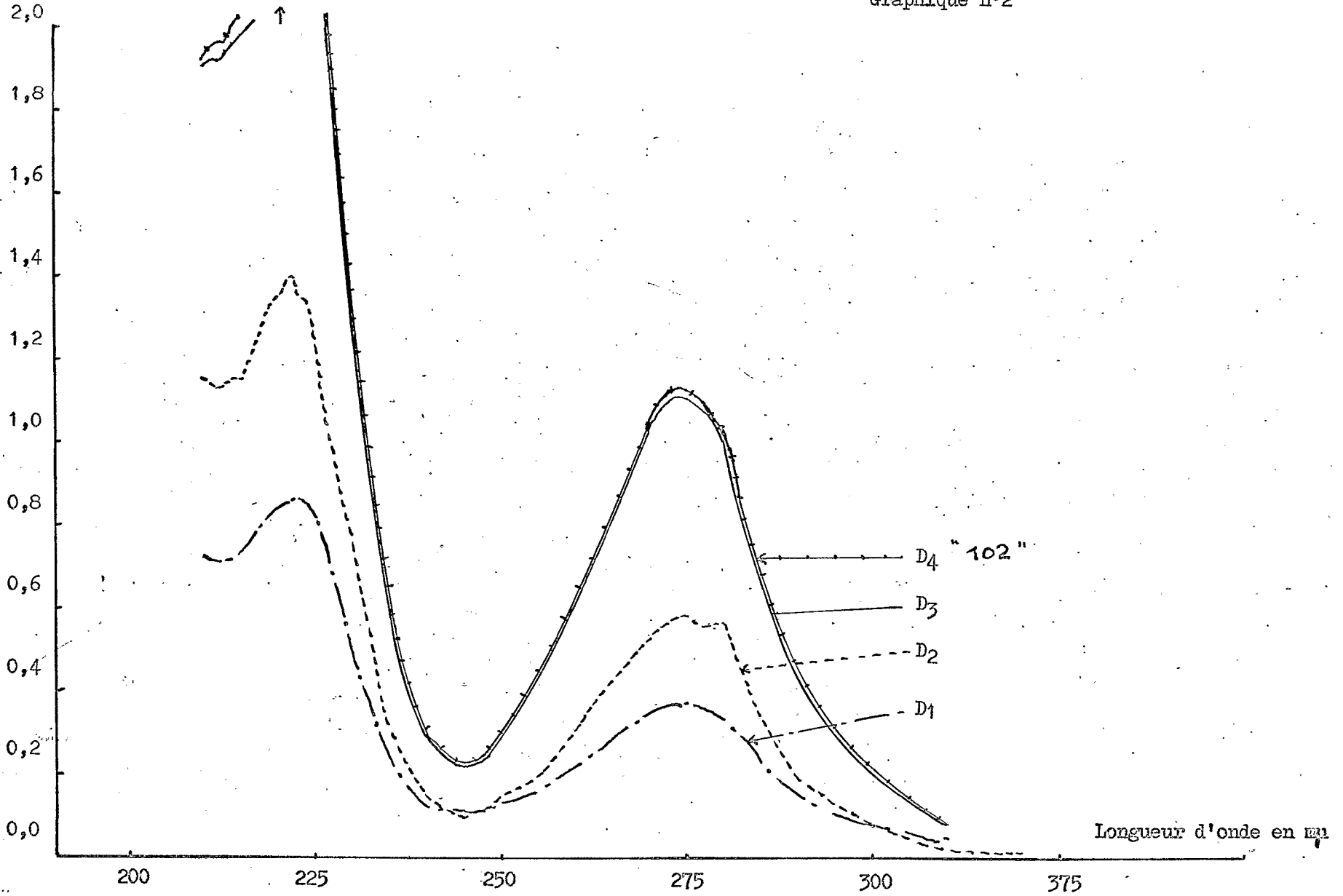
D1	2.300	$\mu\text{g/ml}$
D2	3.950	"
D3	7.200	"
D4	7.300	"

Pour D1 la concentration minimale inhibitrice s'établit à 220  $\mu\text{g/ml}$  pour la plupart des champignons filamenteux.



ABSORPTION

Graphique n°2



#### 4<sup>o</sup>) Recherches portant sur la nature de l'excipient.

Les guérisons de teigne provoquée sur animaux obtenues avec le "corps jaune" n'ont pas été reproduites en utilisant la seule substance phénolique que contient le distillat. Le "corps jaune" comprenant la substance active et un caroténoïde était dissous dans l'huile de vaseline. Les résultats de divers essais ont montré que le caroténoïde ne joue aucun rôle in vitro. Il doit être vérifié prochainement s'il en est de même in vivo. En solution dans l'éther de pétrole son spectre d'absorption est voisin de celui du  $\beta$  carotène dans le même solvant (cf graphique n° 3). Le caroténoïde liposoluble peut être le véhicule naturel de la substance phénolique et être nécessaire à son activité dans les tissus animaux envahis par le champignon.

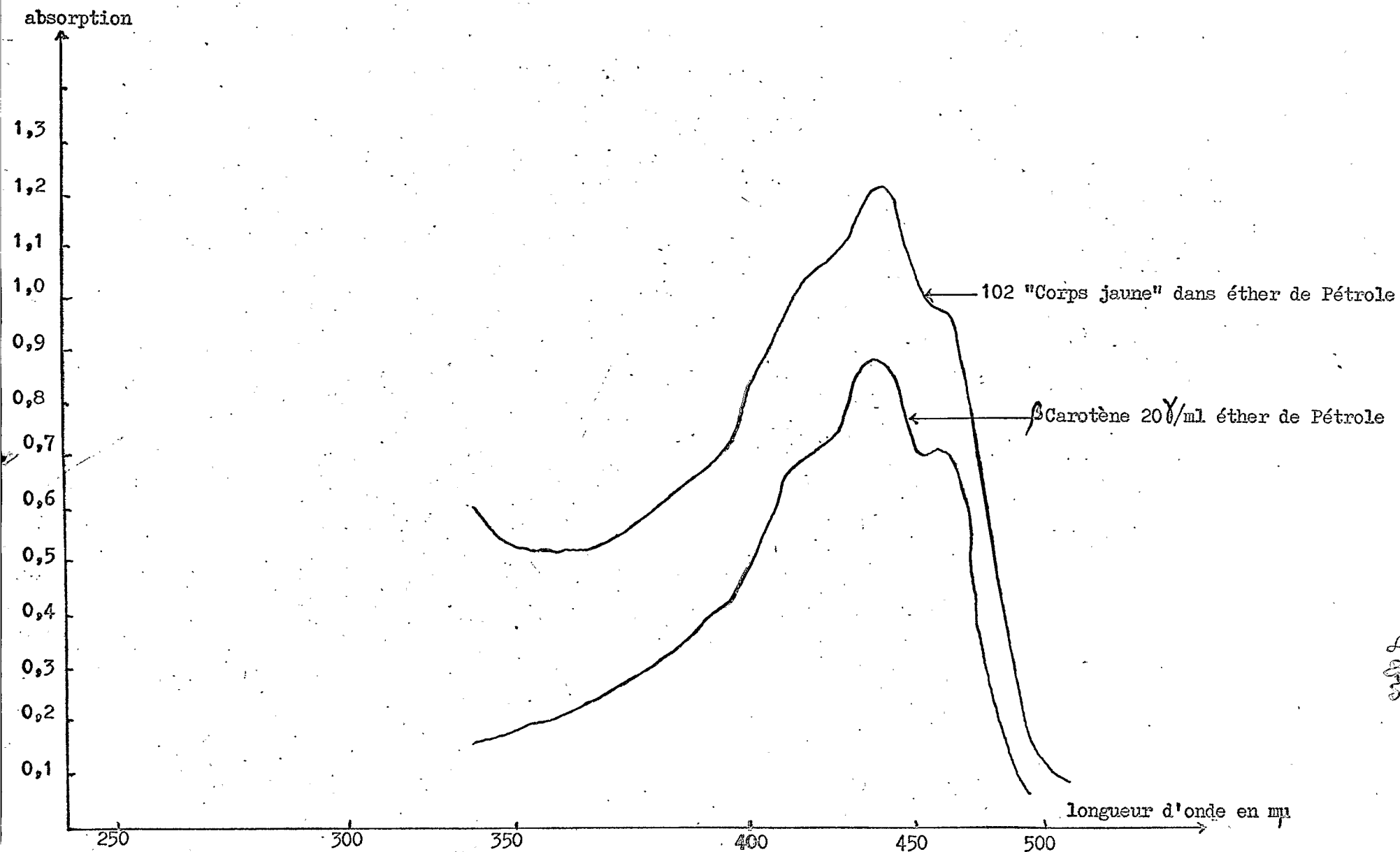
#### Nature de l'huile à utiliser comme excipient.

Le distillat est mélangé en tube à diverses huiles : huile d'olive, d'arachide, de palme, de colza, de ricin, de lin et à deux huiles minérales de viscosité différente. Le mélange est agité à intervalle régulier sur un "automatic-mixer" pendant une journée. On laisse reposer une nuit. L'activité antifongique est recherchée dans les deux phases après décantation. Elle ne se retrouve que dans les huiles minérales. Les huiles végétales doivent donc être écartées.

Etant donné l'importance que présentent les mycoses viscérales - mycoses pulmonaires notamment - et le peu de moyens thérapeutiques dont on dispose, l'administration par voie interne est envisagée. Des solutés de chlorure de sodium à 0,9 % et 10 %, glucosés ou non, ont été préparés. Ils sont actifs in vitro. Le pH du distillat D2, le plus employé est de 3,1. Amené à 5,5 par addition de citrate de sodium normal il conserve intégralement son activité. Des essais de traitement de mycoses internes provoquées vont être tentés avec ces préparations.

Nous nous proposons enfin de rechercher dans des plantes plus courantes que Prunus Lusitanica la substance active ou un composé proche qui permettrait une synthèse partielle. Des indications intéressantes ont déjà été recueillies sur ce point.

Graphique n°3



24/10

SUR LA PRESENCE DE SAPONINES ANTIFONGIQUES DANS LES

TISSUS FOLIAIRES D'UNE LILIACEE

Marcel MEIFFREN et Madeleine HARDY

A partir des feuilles et de tiges aériennes de Polygonatum multiflorum All. (liliacée), a été isolée une saponine présentant des propriétés fongistatiques.

La recherche de substances antifongiques dans la série végétale (1) a permis de constater qu'un extrait de plantes appartenant à la famille des liliacées présentait une action fongistatique remarquable.

METHODES.

Des extractions successives ont été faites avec divers solvants, à partir de feuilles et de tiges aériennes de Polygonatum multiflorum All. séchées à l'air, à température ambiante, puis réduites en poudre.

Le pouvoir inhibiteur est vérifié à chaque stade de purification sur la croissance d'une Mélanconniée, le Pestalozzia coffeicola Av. Sacca, soit en milieu liquide soit en milieu solide.

Dans le premier cas, le milieu nutritif est versé dans le tube après évaporation sous vide du solvant. Dans le second cas, l'évaporation s'effectue en présence de poudre de cellulose pour faciliter la répartition dans le milieu gélosé maintenu à 50° C.

Des extraits obtenus avec l'eau, le méthanol, l'éthanol 70°, l'éthanol 95° et le trichloréthylène ont présenté une action antifongique. Les extraits préparés à partir d'éther de pétrole, d'éther éthylique, d'acétone et d'acétate d'éthyle ont été sans action sur la croissance du champignon.

D'autre part, des extractions directes et la comparaison des concentrations minimales d'inhibition nous ont conduit à choisir le méthanol et à préciser une méthode d'extraction. L'extrait méthanolique, concentré à sec, est repris par du méthanol 50 % et lavé avec de l'éther de pétrole. Après une nouvelle concentration sous vide, l'extrait est repris, soit par le méthanol, soit par l'eau pour effectuer les contrôles chromatographiques et biologiques.

#### DETERMINATION ET CARACTERISATION DE LA SUBSTANCE ACTIVE.

Par chromatographie ascendante sur papier, à une dimension, neuf bandes ont été séparées en utilisant comme solvant la phase supérieure du mélange butanol, acide acétique/eau, 4/1/5. Les bandes ont été délimitées en lumière ultra-violette.

Le contrôle biologique a mis en évidence une action fongistatique pour l'éluat méthanolique de la bande n° 3, dont le Rf est voisin de 0,20.

Des chromatographies à deux dimensions ont été réalisées sur cet extrait, dans le but de caractériser la substance active. Le même type de papier a été utilisé ainsi que le même solvant pour la première dimension et l'acide acétique 10 % pour la seconde.

Les chromatogrammes examinés en lumière ultra violette présentaient des taches dont la fluorescence pouvait laisser supposer la présence de composés phénoliques. Les réactifs suivants ont alors été utilisés : chlorure d'aluminium, borohydrure de sodium, "fast blue salt BB" (sels diazotés), carbonate de sodium, trichlorure d'antimoine dans le chloroforme.

Le chlorure d'aluminium a révélé la présence de trois taches, dont deux, de coloration jaune visible et jaune-vert en lumière ultra-violette, correspondent à des flavonoides, dont la rutine ; et une tache brun jaune ayant un Rf voisin de 0,20 dans le sens du solvant butanol/acide acétique/eau, et de 0,91 dans le sens acide acétique.

Ces trois taches ont été éluées par du méthanol. Un contrôle biologique a montré que la substance active correspondait à la troisième tache, les flavonoides étant sans action.

Après les composés phénoliques, notre attention s'est portée sur les saponines, substances qui se rencontrent fréquemment chez les liliacées.

Effectivement l'extrait actif a réagi positivement avec la p-diméthylaminobenzaldéhyde : coloration rose dans le visible et en lumière ultra-violette. Elle réagit aussi avec l'anisaldéhyde, l'aldéhyde cinnamique, la vanilline chlorhydrique et le trichlorure d'antimoine (2).

Cette saponine se caractérise en outre par le p-aminoéthyl-diphényl-borate, appelé aussi "réactif A pour produits naturels" (3), et borohydrure de sodium. Elle n'est pas hémolytique ; son indice de mousse est de 200.

#### CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE.

La croissance du champignon témoin Pestalozzia coffeicola Av. Sacca est inhibée à la dose de 25 milligrammes de poids sec de matériel végétal de départ par millilitre de milieu pour l'extrait méthanolique et à la dose de 15 mg/ml pour la substance obtenue par élution.

Précisons que cette substance purifiée est fongistatique et non fongicide.

- (1) M. MEIFFREN, J. TANGUY, M. HARDY, Conf. Intern. Rech. Agron. Cacaoyères, Abidjan, 15-20 Nov. 1965, PARIS (1967), p. 184-194.
- (2) C. SANNIE, H. LAPIN, Bull. Soc. Chim. Fr., 1952, p. 1080-1085.
- (3) K. RANDEKATH, Chromatographie sur couches minces, Gauthier-Villars, Paris, 214 p.